博士論文を要約したもの

博士論文題目

Photoactive Yellow Protein における異常な プロトン化状態を示すアルギニンに関する研究

氏 名 米澤 健人

蛋白質の機能発現過程では、ほぼ例外なくプロトン移動反応が利用されている。プロトン移動反応はドナー・アクセプター基のプロトンの解離・結合反応によって構成されていることから、蛋白質による各反応基の pK_a 制御機構を理解することは、蛋白質の機能発現機構解明において本質的である。本研究では、光センサー蛋白質(PYP)で発見された異常なプロトン化状態をとるアルギニン(Arg52)とその環境に着目し、その pK_a の制御・調節機構を明らかにすることを目的としている。得られた成果は以下の通りである。

- 1) E46Q変異体の X線・中性子結晶構造解析から、Glu46 を Gln に置換することで、 Arg52 の近傍に存在する低障壁水素結合(LBHB)が通常の水素結合へと変化する ことを明らかにした。
- 2) この水素結合の変化に伴い、Arg52 においてカチオン型が占める割合が 24% (野生型) から 67% (変異体) まで増加することがわかった。以上の結果から、Glu46-pCA 間の水素結合が Arg52 の pKa調節に関与していることを明らかにした。
- 3) Arg52 が存在する蛋白質表面クレフト内が解離性アミノ酸残基に与える影響を調査するために、R52 をアスパラギン酸に置換し、その pK_a を同定した。アスパラギン酸の側鎖の pK_a は水溶液中での 3.8 であるのに対し、クレフト内では 7.5 まで上昇してことが明らかとなり、クレフト内が疎水的な環境であることを示した。
- 4) 光反応過程における Arg52 のプロトン化状態の変化を調べるため、赤外吸収分光測定と密度汎関数理論(DFT)計算を行った。本解析によって PYP_L において Arg52 はカチオン体となっていることが明らかになった。2)の結果を踏まえ、 光反応で生じる pCA の異性化により Glu46-pCA 間の LBHB が通常の水素結合に 変化したことで、Arg52 の pK_a の増加したために生じた反応であることを示した。

以上の結果、光センサー蛋白質(PYP)では、暗状態で電気的中性に保たれた Arg52が、pCAの異性化反応に伴う水素結合の変化を介して、その pK_a が能動的に制御・調節されプロトン化状態を変化させることが明らかとなった。更に、Arg52 が PYP_L 中間体でカチオン体になることによって、活性中間体における Arg52 の側鎖構造変化が誘起されていることが示唆された。この一連の表面電荷の変化によって、蛋白質間相互作用が制御されているとのモデルを提唱し、PYP の作動原理の一端を示すに至った。